

Oligoszacharid-fehérje konjugátumok előállítása

OTKA ny.sz.: 35128

A kutatási időszakban elért eredmények három csoportba sorolhatók:

1. Mikobakteriális eredetű sejtfelszíni oligoszacharidok előállítása,
2. A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharid di- tetraszacharid fragmenseinek előállítása, különböző N-védőcsoportok tanulmányozása.
3. BSA-ra történő konjugálási kísérletek

1. Mikobakteriális eredetű sejtfelszíni oligoszacharidok előállítása,

Folytatva az MTA-DE Szénhidrátkémiai kutatócsoportban megkezdett korábbi munkákat, a következő három pentaszacharidot állítottuk elő:

4-(Me-CH(OH)-CONH)-3-OMe-4,6-dd-Glcp-(1-3)-4-OMe-Rhap-(1-3)-Rhap-(1-3)-Rhap-(1-2)-6d-Talp (1)

M. avium serovar 12

3-(Me-CH(OH)-CH(Me)-CONH)-3,6-dd-Glcp-(1-3)-4-OMe-Rhap-(1-3)-Rhap-(1-3)-Rhap-(1-2)-6d-Talp (2)

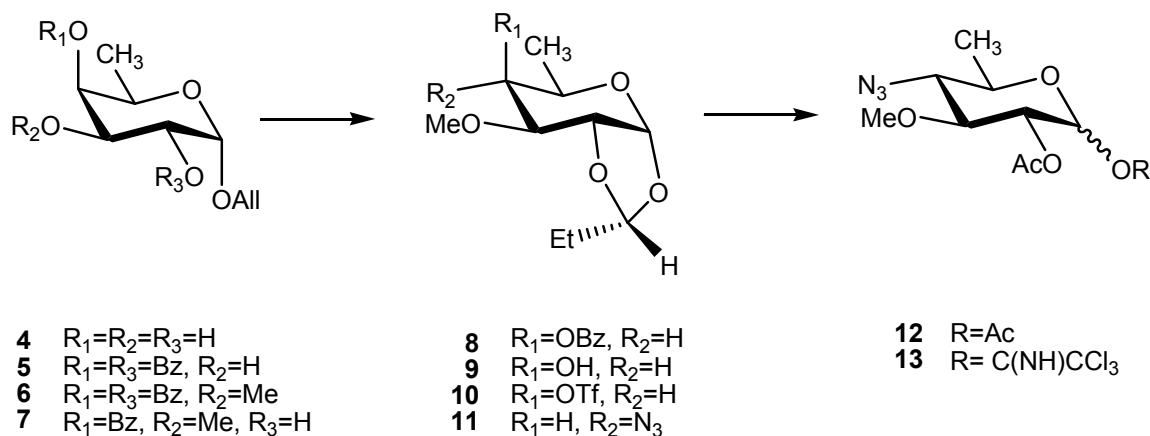
M. avium serovar 17

3,4-di-OMe-GlcpA-(1-3)-3-CMe-2,4-di-OMe-Rhap-(1-3)-Rhap-(1-3)-Rhap-(1-2)-6d-Talp (3)

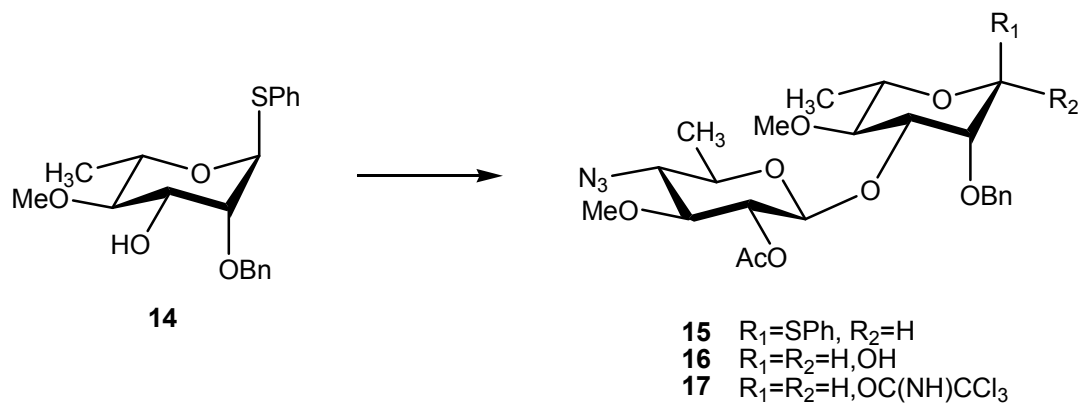
M. avium serovar 19

A *Mikobakterium avium 12.* szerovariáns pentaszacharid hapténjének előállításához módszert kellett kidolgozni a nem redukáló végen levő 4-amino-4,6-didezoxi-D-glükopiránóz (un. D-viosamin) 3-O-metil származékának előállítására, megfelelően védett formában, glikozil donorként. Ezt a feladatot allil-fukozidból (4) kiindulva oldottuk meg. Kialakítva a 3,4-ortobenzoátot, benzoilezve a 2-hidroxilt, majd nyitva az ortoésztert, jó hozammal volt preparálható az 5 2,4-di-O-benzoil származék, melynek metilezését diazo-metánnal végeztük el (6). Izolált acilcsoportok szelektív dezacilezése ismert az irodalomból. Mivel a 6-vegyület mindkét acilcsoportja izolált, a regioszelektív hasítás nem volt könnyen tervezhető. Esetünkben a 2-O-benzoil csoport jóval könnyebben hasadt, mint a 4-O-benzoát (7). A 7

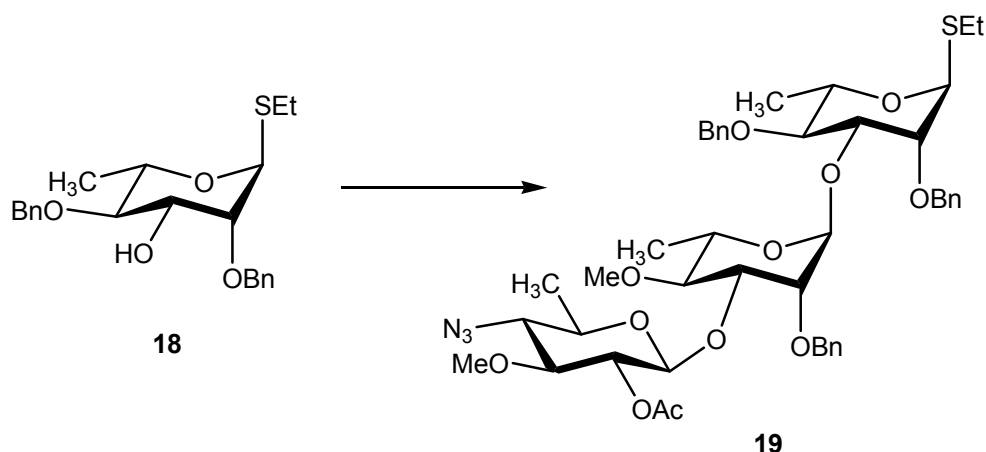
vegyület kiváló intermedierek bizonyult. Az 1 és 2 hidroxilcsoportjait 1,2-propilidén acetál formájában védtük az allil aglikont felhasználva. Ennek izomerizálásával, majd gyűrűzárásával állítottuk elő **8**-at. A **10** triflátból kiindulva a **11** dezoxi-azido származék szintézise ezután már nem okozott gondot, az átmeneti védőcsoportként alkalmazott propilidén acetál savas eltávolítása, a termék acetilezése, az anomer acetil csoport regioszelektív hasítása és triklóracetimidát képzés után nyertük a **13** glikozil donort.



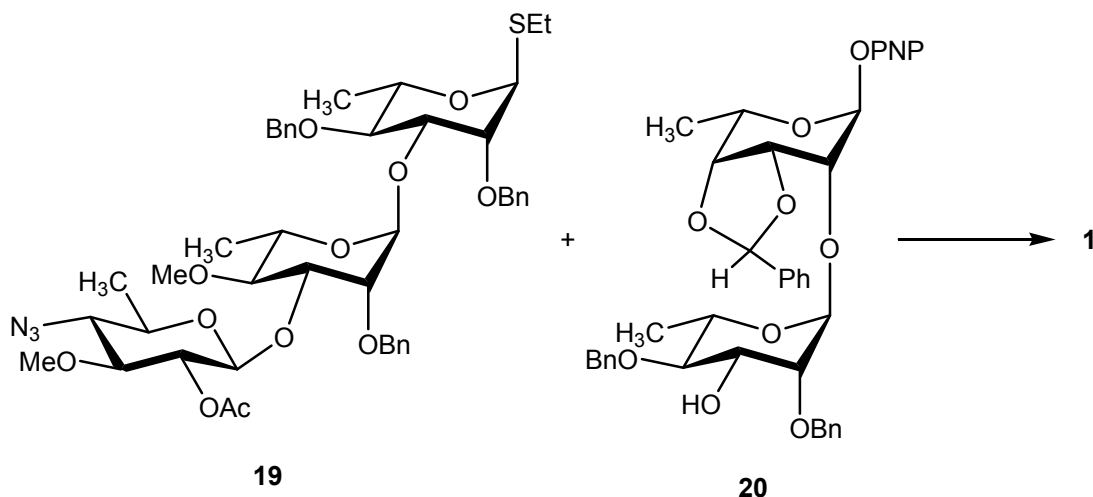
Az így előállított donorral glikozilezve a **14** akceptort, 63% -os hozammal nyertük a **15** diszacharidot. Eredeti terveinkben 2+3 blokk szintézis szerepelt, melyhez a **15** diszacharid donort terveztük használni. Ez a stratégia azonban nem bizonyult sikeresnek, ezért a feniltio glikozidot a **17** glikozil triklóracetimidáttá alakítottuk két lépésben.



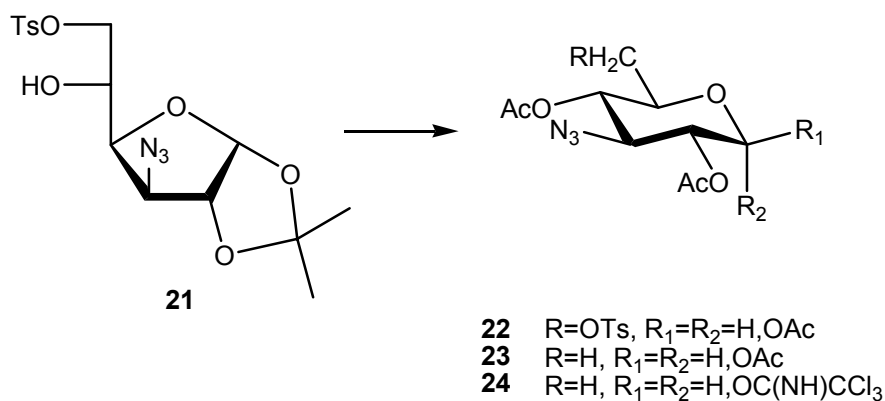
Glikozil akceptorként a **18** etiltio-glikozidot használtuk a **17** donorral végzett kapcsolatban, és a TMSOTf katalizált reakcióban 74%-os hozammal sikerült preparálni a **19** triszacharidot.



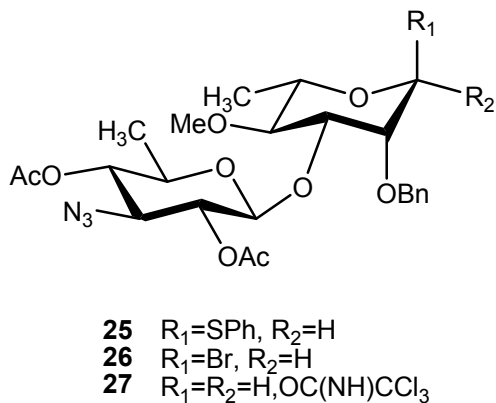
A **19**, lévén hogy tioglikozid, mindenféle további átalakítás nélkül használható volt a következő glikozilezési lépésben, melyben a korábban már több esetben is sikeresen használt **20** diszacharidot alkalmaztuk mint akceptort. A vanBoom módszerével végzett aktiválást használva 50%-os hozammal izoláltuk a célvegyületünket.



A *Mikobakterium avium* 17. szerovariáns pentaszacharid hapténjének előállításához módszert dolgoztunk ki a nem redukáló végen szereplő 3,6-didezoxi-3-azido származék szintézisére. Kiindulási anyagnak az irodalomból ismert 3-azido-3-dezoxi-1,2-O-izopropilidén-6-O-tozil-a-D-glükofuranózt (**21**) használtuk. A **21** vegyület izopropilidén csoportjának savas hidrolízisét, majd a termék acetilezését követően állt elő a **22**-es acetát, melynek redukciójával a **23** 6-dezoxi származékhoz jutottunk. A glikozil donorrá alakítás a klasszikus módon történt: regioszelektív dezacetilezés, majd triklóracetimidát-képzés Schmidt módszerével.

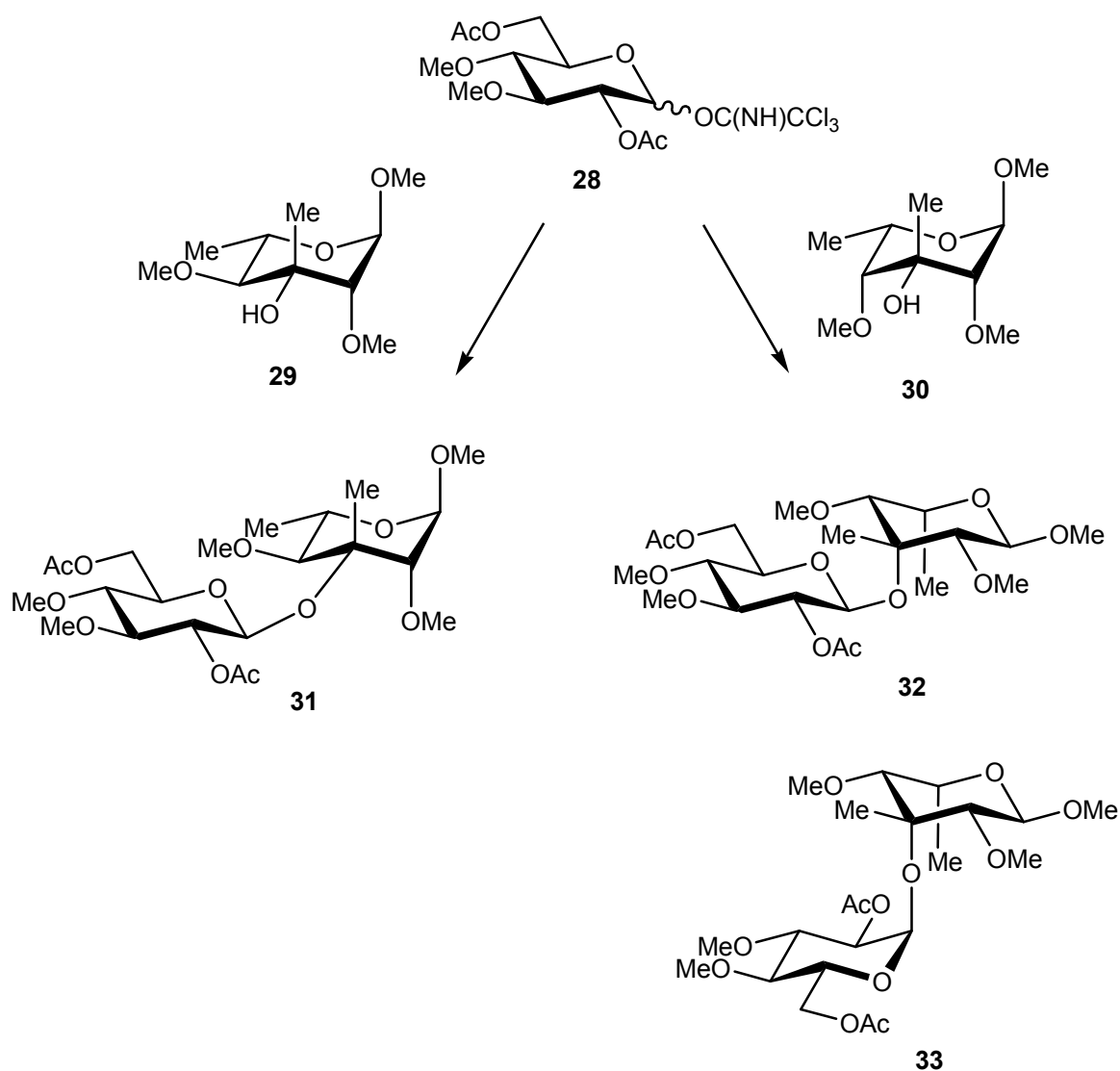


A **24** glikozil donor és **14** glikozil akceptor TMSOTf-katalizált reakciójában 75%-os termeléssel képződött **25** diszacharidot a célvegyület 2+3 blokkszintézisére kívántuk használni. A tioglikozidból előállítottuk a **26** glikozil bromidot és a **27** glikozil triklóracetimidátot is. Különböző reakciókörülményeket próbáltunk a fenti donorok aktiválására, de sajnos egyik sem vezetett eredményre a 2+3 blokkszintézisben.



Ezért a már korábbról ismert **18** glikozil akceptorral reagáltattuk a **27** glikozil triklóracetimidátot és az így nyert triszacharid valamint a **20** glikozil akceptor felhasználásával, 69%-os hozammal sikerült izolálni célvegyületünket.

A *Mikobakterium avium* 19. szerovariáns pentaszacharid haptenjének szintéziséből szintén a nem redukáló végi diszacharidot emeljük ki. A **29** és **30** glikozil akceptorok előállítását korábban közöltük, itt csak a **28** glikozil donorral való reakció eredményét prezentáljuk. A **28** és **29** reakciójában tisztán a β -anomer képződött, míg **28** és **30** esetében α,β -keveréket kaptunk annak ellenére, hogy résztvevő csoport volt a donor 2-helyzetében. A szerkezet másik érdekessége az akceptor konformációjának megváltozása, amit NMR-módszerekkel egyértelműen igazolni tudtunk.

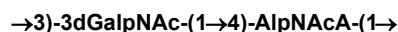
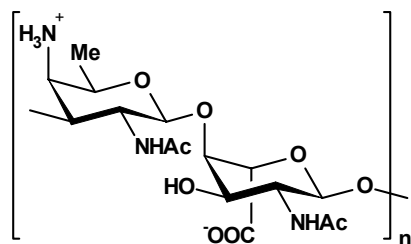


A pentaszacharid felépítéséhez a már korábban alkalmazott **18** és **20** építőelemeket használtuk, építve a korábbi tapasztalatokra, a 3+2 blokkszintézist alkalmazva.

Az eredményeket két nemzetközi folyóiratban már megjelent közlemény írja le, valamint egy további fogadtak el közlésre.

2. A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharid di- tetraszacharid fragmenseinek előállítása, különböző N-védőcsoportok tanulmányozása.

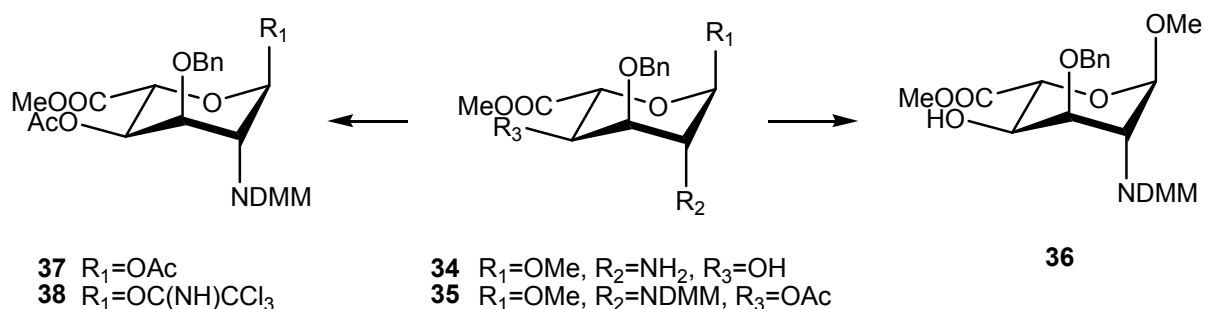
A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharid di-, tri- és tetraszacharid fragmenseinek előállítására korábban módszereket dolgoztunk ki, mely eredményeket közlemények formájában tettünk publikussá.



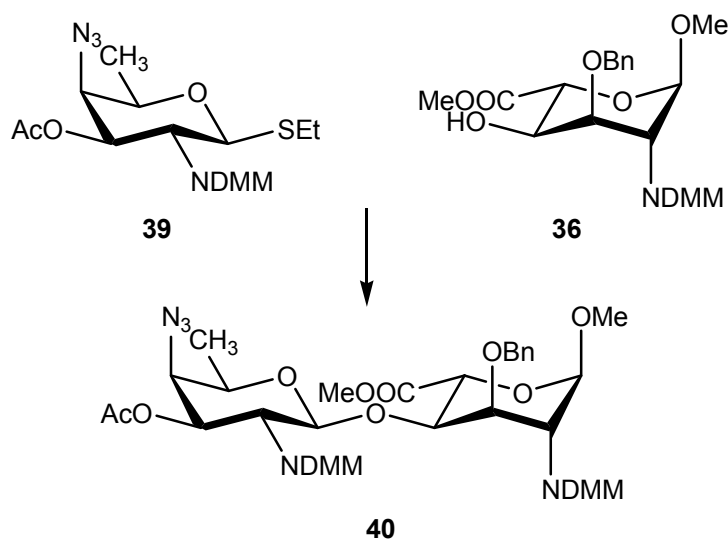
A szintézis során számos probléma jelentkezett, amit az *N*-védőcsoport eltávolításának nehézsége okozott. Megvizsgáltuk az *N*-ftálimido, az *N*-tetraklórftálimido, az *N*-triklóretoxikarbonil és az *N*-triklóracetil csoportokat, melyek közül az *N*-triklóracetil csoportot sikerült elfogadható hozammal hasítani a szintézisút végén.

Ezért célul tűztük ki az *N*-DMM csoporttal (dimetil maleimido) védett tridezoxi galaktóz és az *L*-altruronsav előállítását, és ezek alkalmazását glikozilezési reakciókban.

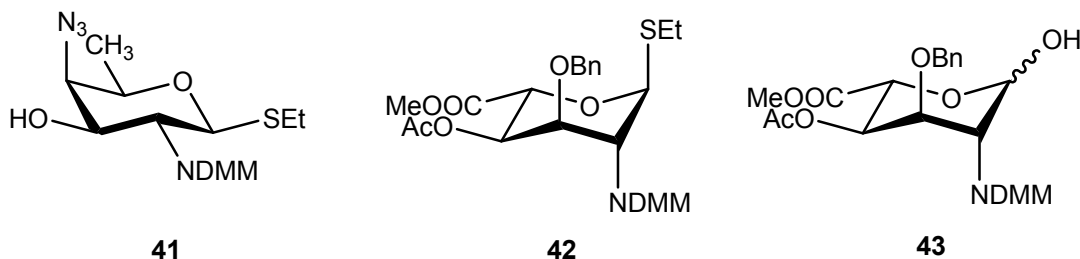
Az *N*-DMM csoporttal védett altruronsav-származék szintéziséhez az általunk korábban leírt 2-amino-2-dezoxi-3-*O*-benzil-származékot (**34**) használtuk. Az *N*-DMM csoportot hasonlóan jó hozammal lehetett kialakítani, mint a ftálimido, tetraklórftálimido vagy triklóracetamido csoportot. Glikozil donorra alakítás szempontjából a triklóracetil csoporthoz képest előnye, hogy a metil glikozid acetolizálható volt elfogadható hozammal (65%). A glikozil acetátból (**37**) ezt követően Schmidt módszerével **38** glikozil triklóracetimidátot készítettünk. Ezzel egyidőben előállítottuk a metil-(metil-3-*O*-benzil-2-dezoxi-2-dimetilmaleilimido-*L*- α -altropiranozid)-uronát) (**36**) glikozil akceptort is.



A 4,6-didezoxi-galaktopiranozid származékból is problémamentesen elő lehetett állítani a **39** glikozil donort, valamint a **41** glikozil akceptort.



Az NDMM-csoporttal védett származékokkal végzett glikozilezések során megállapítottuk, hogy a **39**-es tioglikozid donor és a **36**-os akceptor reakciójával jó hozammal képződik a **40**-es számú diszacharid. Ugyanakkor a **41** tioglikozid akceptor és a **38** glikozil-triklór-acetimidát reakciójában nem képződött diszacharid, helyette a glikozil donor hidrolízisét (**43**) illetve mellékreakcióként tiotranszfert (**42**) figyeltük meg. Ez azt jelenti, hogy a DMM-védőcsoport nem alkalmazható nagyobb tagszámú oligomer előállítására.



Ezzel egyidőben elvégeztük a védett, valamint a szabad di-, tri- és tetraszacharidok MALDI-MS analízisét is. Mind a DHB, mind a THAP jó mátrixnak bizonyultak a

felvételekhez, az N-triklóracetamido csoporttal védett cukrok esetében azonban a THAP sokkal jobb eredményeket adott. Teljes szekvencia-analízis és szerkezetigazolás tett lehetővé a MALDI PSD technika alkalmazása, még ilyen bonyolult szerkezetű oligoszacharidok esetében is.

Az eredményekből két diplomamunka és egy nemzetközi folyóiratban közölt publikáció született.

3. BSA-ra történő konjugálási kísérletek

A mikobakteriális eredetű sejtfelszíni oligoszacharidok szintézisekor eleve olyan spacerrel láttuk el a molekulákat, melyek alkalmassá teszik azokat aktiválás utáni konjugálásra. A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharid fragmenseinek előállításakor O-metil aglikont használtunk, de a konjugálásukhoz tiol, vagy halogenid-tartalmú spacer tervezünk használni. Mivel ezen oligoszacharidok előállítása meglehetősen körülményes, a BSA-hoz való konjugálás körülményeit egy egyszerű modellvegyülettel dolgoztuk ki. A konjugáláshoz a kén-szén kovalens kötés kialakítását használtuk fel. Mindkét lehetséges módszert megvizsgáltuk: 1) tiolcsoportot tartalmazó spacer reagáltattunk halogeniddel módosított BSA-val, 2) tiolcsoportokkal aktivált BSA-val reagáltattunk halogéntartalmú spacerrel ellátott cellobiozidot.

Elsőként meghatároztuk a fehérje módosításához szükséges körülményeket a reagens mennyiségén változtatva. Brómacetamido, illetve 2,3-dibróm-propionamido csoportokkal módosítottuk a BSA-t. A fehérjén végbement változást MALDI-TOF tömegspektrometriával mutattuk ki. Mindkét esetben elmondható, hogy jó hatásfokkal sikerült módosítani a fehérje amincsoportjait. Esetünkben maximum 25-szörös volt az a szubsztitúciós fok, amit el lehetett érni. Nagyobb szubsztitúciós fok esetében (nagyobb reagens-fölösleg) a fehérjét a dialízis és a liofilizálás után már nem tudtuk visszaoldani. Ezen a szubsztituálás során alkalmazott puffer összetételének módosításával sem sikerült változtatni. Az is megfigyelhető volt, hogy a reagens mennyiségének változásával nem lineárisan változik a szubsztitúciós fok. A BSA tiolcsoportokkal történő szubsztituálásához ditiopropionsavat használtunk (természetesen aktív észter formában). Az így módosított fehérjén közvetlenül a konjugálás előtt szabadíthatók fel a tiolcsoportok ditiotreitolos kezeléssel. A BSA ditiopropionsavas szubsztituálása kisebb hatékonyságú volt, mint azt a brómacetamido, vagy a 2,3-dibróm-

propionamido csoportok esetében tapasztaltuk. Valószínűsítjük, hogy ennek oka a reagens nagyobb térigénye lehet, de ezt tovább nem vizsgáltuk.

A módosított BSA-hoz történő konjugáláshoz nagy főlöslegben használtuk a megfelelő spacerrel ellátott cukorszármazékot. Kísérleteinkből megállapítottuk, hogy a tiolcsoporttal aktivált BSA és a 8-jód-3,6-dioxa-oktil-spacerrel ellátott cellobiozid esetében átlagban 6-szoros szubsztitúciós fok volt elérhető. A brómacetamido csoporttal aktivált BSA és a 8-merkaptó-3,6-dioxa-oktil-spacerrel ellátott cellobiozid esetében átlagban 23-szoros szubsztitúciós fokú termék, a 2,3-dibróm-propionamido-csoporttal módosított BSA esetében pedig 15-szörös szubsztitúciós fokú termék keletkezett.

Megállapítható tehát, hogy a tiolcsoportot tartalmazó spacerrel ellátott cellobióz és a brómacetamido (vagy 2,3-dibróm-propionamido) csoporttal aktivált fehérje reakciójában nagyobb hatásfokkal képződik a glikokonjugátum, mint fordított esetben. Ennek egyik oka a merkaptocsoportokkal aktivált BSA fokozott érzékenysége lehet melynek következtében a merkaptocsoportok egy része oxidálódhat az aktiválást követő hosszadalmas tisztítási procedura alatt.

A 2,3-epoxiprop-1-il glikozidok az irodalomból mint enzimek szelektív inhibitorai ismertek, de szénhidrátok fehérjékhez való kötésére eddig nem nyertek alkalmazást. Ezért előállítottuk a 10-oxiranil-3,6-dioxa-9-tio-decil-1-tio-cellobiozidot, és vizsgáltuk konjugálását BSA-hoz. Vizsgálatunk eredményei összefoglalva elmondhatjuk, hogy csak nagyon kis hatásfokkal sikerült elvégezni a konjugálást.

Az eredményekből egy diplomamunka született

A pályázati támogatás további hozadéka egy olyan bibliográfiai szoftver (Reference Manager) beszerzése, mely segítségével könnyű a közlemények hivatkozási adatainak nyilvántartása, megszerkesztése. Ez a szoftver tette lehetővé, hogy a pályázati időszak utolsó fél évében összegyűjtött közlemények feldolgozása után, az Elsevier kiadó gondozásában kiadásra kerülő többkötetes összefoglaló mű egy fejezete elkészülhessen.